

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



4  
**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



DE 99/4112  
REC'D 21 FEB 2000

WIPO PCT

## Bescheinigung

Die Anmelderin Max Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin/Deutschland hat  
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors und ihre Verwendung,  
insbesondere für die Diagnostik der Präeklampsie"

am 24. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen  
Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K  
und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 1. Februar 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Wehner

Aktenzeichen: 198 60 320.7



Anmelder: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Erfinder: Dr. Wallukat, Dr. Homuth, Prof. Luft

Peptide des  $AT_1$ -Rezeptors und ihre Verwendung, insbesondere für die Diagnostik der Präeklampsie

Zusammenfassung

~~Die Erfindung betrifft Peptide des  $AT_1$ -Rezeptors und ihre~~  
Verwendung in antigenen und immunogenen Mitteln, insbesondere für die Diagnostik der Präeklampsie. Bevorzugt ist ein Peptid mit der Sequenz AFHYESQ.

## Peptide des $AT_1$ -Rezeptors und ihre Verwendung, insbesondere für die Diagnostik der Präeklampsie

Die Erfindung betrifft Peptide des  $AT_1$ -Rezeptors und deren Verwendung und ihrer Folgeprodukte in antigenen und immunogenen Mitteln bzw. Testkits, insbesondere für die Diagnostik der Präeklampsie. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Anti- $AT_1$ -Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten.

Die Präeklampsie ist eine schwangerschaftsspezifische Hochdruckform und zählt zu den wichtigsten Ursachen von mütterlichen Todesfällen während der Schwangerschaft und unter der Geburt. Eine noch größere Bedeutung hat die Präeklampsie für das Schicksal der Frucht, das heißt sie ist verantwortlich für Frühgeburtslichkeit, Wachstumsretardierung und perinatale Sterblichkeit.

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Erkenntnisse gewonnen wurden, sind die Ursachen dieses Krankheitsbildes weiterhin nicht geklärt. Die einzige kausale Therapie ist die vorzeitige Beendigung der Schwangerschaft. Dies ist jedoch bei frühem Auftreten der Krankheitssymptome, das heißt insbesondere vor der 20. Schwangerschaftswoche, kaum mit dem gesunden Überleben des Kindes vereinbar. Auf der anderen Seite kann jeder Tag der Verlängerung einer Schwangerschaft in dieser kritischen Zeitspanne die kindlichen Überlebenschancen verbessern. Beste Voraussetzungen, dieses Ziel zu erreichen, bieten eine frühzeitige Erkennung (Diagnose) der Entwicklung einer Präeklampsie und darauf aufbauende Überwachungs- und symptomatische Behandlungsverfahren.

A Die Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Substanzen zu finden, die den Nachweis der Präeklampsie ermöglichen, und diese in entsprechenden Testsystemen bereitzustellen.

Die Erfindung beruht auf dem erstmaligen Nachweis, daß Patientinnen mit Präeklampsie spezifische Antikörper gegen blutdruckwirksame Angiotensin-AT<sub>1</sub>-Rezeptoren aufweisen. Bei Frauen mit normaler Schwangerschaft traten diese Antikörper nicht auf, ebenso nicht bei Schwangeren mit einer chronischen Hypertonie, das heißt einer schwangerschaftsunabhängigen Hypertonie. Die beobachteten Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper führen zu einer Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, die wahrscheinlich mitverantwortlich ist für gefährdende Blutdruckerhöhungen und eine akute Durchblutungsver-schlechterung lebenswichtiger mütterlicher und kindlicher Organe.

Serumproben von Patienten mit Präeklampsie enthalten Autoantikörper, die gegen den Angiotensin-II-AT<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp gerichtet sind. In einem Bioassay entfalten diese Antikörper einen positiv chronotropen Effekt. Dieser Effekt wird wie der des Angiotensin II durch den subtypselektiven AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker Losastan unterbunden. Alpha- und beta-adrenergene Antagonisten und der AT<sub>2</sub>-Rezeptorblocker PD 123319 waren ohne Einfluß.

Es wurde überraschend festgestellt, daß die Antikörper ein Epitop auf der zweiten extrazellulären Schleife des AT<sub>1</sub>-Rezeptors erkennen und daß sie mit Hilfe von Peptiden, die dieser Schleife entsprechen, neutralisiert bzw. affinitäts-chromatographisch gereinigt werden können. Das Epitop ist durch die Aminosäuresequenz AFHYESQ charakterisiert.

Gegenstand der Erfindung sind somit Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, bestehend aus 5 bis 10 Aminosäuren sowie ihre Mutanten und Varianten, die ein Epitop bilden und Autoantikörper binden können, die bei Präeklampsie vorkommen.

Bevorzugt sind Peptide, die ganz oder teilweise oder als Variante der SEQ ID Nr. 1 AFHYESQ aufgebaut sind.

Die Peptide werden nach an sich bekannten Verfahren durch Aufbau der Aminosäuren synthetisiert oder gentechnisch hergestellt.

Erfindungsgemäße Antikörper, die gegen das Epitop des  $AT_1$ -Rezeptors gerichtet sind, sind dadurch gekennzeichnet, daß sie diese Peptide erkennen. Bevorzugt erkennen sie das Peptid der SEQ ID Nr. 1 bzw. seine Mutanten und Varianten. Sie werden nach an sich bekannten Verfahren durch Immunisierung von Kleinsäugern oder Immunisierung von Milzzellen in vitro mit den erfindungsgemäßen Peptiden hergestellt.

---

Anwendung finden die Antikörper in verschiedenen Bio-Assays, immunologischen Nachweissystemen und ELISA-Testsystemen.

Weiterhin betrifft die Erfindung antigene Mittel zum Nachweis von Präeklampsie, die mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid vorzugsweise das Peptid der SEQ ID Nr. 1, enthalten. Sie reagieren mit den bei Präeklampsie vorkommenden spezifischen Antikörpern gegen blutdruckwirksame Angiotensin- $AT_1$ -Rezeptoren. Ggf. sind die antigenen Mittel an verschiedene Träger gebunden, wie z.B. aktivierte Sepharosen, Zellulosen oder Polystyrolträger.

Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide besteht in immunogenen Mitteln. Diese enthalten mindestens ein Peptid, vorzugsweise das Peptid der SEQ ID Nr. 1, das die Produktion von Antikörpern, die fähig sind, Autoantigene bei Präeklampsie zu erkennen, induziert.

Außerdem wird durch die Erfindung eine Testkit zur Bestimmung von Anti- $AT_1$ -Rezeptor-Antikörpern zum Nachweis von Präeklampsie bereitgestellt.

Der Testkit umfaßt

- mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid ggf. an eine feste Phase gebunden
- einen Puffer
- ein spezifisches Konjugat nebst Enzym

- 7
- eine Waschlösung
  - ~~die Substratlösung zum Nachweis der Enzymreaktion~~
  - und eine Stopplösung

Der Bio-Assay umfaßt

- spontan pulsierende neonatale Kardiomyocyten in Primärkultur oder
- aus undifferenzierten embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyocyten
- in einem Kulturmedium

---

Durch Entwicklung des neuen Testkits auf der Basis der erfindungsgemäßen Peptide lassen sich der Nachweis von Präeklampsie und Verlaufsbeurteilungen einfach und schnell durchführen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten. Die zu untersuchende Probe wird mit mindestens einem erfindungsgemäßen Peptid oder mit einer Verbindung dieser Peptide mit einem Trägermaterial unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion zulassen. Der Nachweis wird anschließend mittels an sich bekannter chemischer oder physikalischer Methoden durchgeführt.

Die Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper konnten in allen bisher untersuchten Seren von Patienten mit Präeklampsie nachgewiesen werden. Die Antikörper erscheinen nach der 20. Schwangerschaftswoche und verschwinden nach der Entbindung relativ schnell. Die Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper wurden nicht bei normalen Schwangerschaften bzw. bei schwangeren Hypertonikerinnen nachgewiesen.

Da sich die Antikörper in in vitro Tests wie der Agonist Angiotensin II verhalten, kommt diesen Antikörpern eine Rolle in der Pathogenese oder Präeklampsie zu. Da sie in allen untersuchten Präeklampsieseren nachweisbar sind, sind sie als diagnostische Marker von Bedeutung.



Als Bioassay wurden kultivierte neonatale Rattenherzzellen eingesetzt. Diese Zellen entwickeln eine rhythmische spontane Pulsation und reagieren auf eine Angiotensin-II-Stimulierung mit einer Steigerung der Schlagfrequenz.

Der Nachweis dieser  $AT_1$ -Rezeptor-Antikörper dient erfindungsgemäß sowohl der Früherkennung einer Präeklampsie als auch als Grundlage für neuartige Therapieverfahren.

Gegenstand der Erfindung sind somit auch therapeutische Mittel gegen Präeklampsie, die die Peptide enthalten, da die Entfernung der Angiotensin- $AT_1$ -Rezeptor-Antikörper aus dem mütterlichen Blut (zum Beispiel mittels spezifischer oder unspezifischer Immunadsorption) zu einer Besserung des klinischen Bildes führt oder zumindest eine Progredienz verhindern kann, was mit einer Verminderung der mütterlichen Gefährdung und insbesondere mit einer deutlichen Verbesserung der kindlichen Überlebenschancen verbunden ist.

Die spezifische Immunadsorption wird durchgeführt an einer Säule, die bevorzugt die zweite extrazelluläre Schleife des  $AT_1$ -Rezeptors bzw. die Sequenz ID Nr. 1 enthält.

Die unspezifische Immunadsorption wird durchgeführt an einer Säule, die bevorzugt Schafs- bzw. Hühnerantikörper gegen die humanen Immunglobuline bzw. Protein A oder  $C1_q$  enthält.

Als Säulenmaterial für diese Adsorber wird bevorzugt Sepharose eingesetzt.

9

Patentansprüche

---

1. Peptide des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, bestehend aus 5 bis 10 Aminosäuren sowie ihre Mutanten und Varianten, die ein Epitop bilden und Autoantikörper binden können, die bei Präeklampsie vorkommen.
2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ~~ganz oder teilweise oder als Variante der SEQ ID Nr. 1~~ AFHYESQ aufgebaut sind.
3. Antikörper, die gegen das Epitop des AT<sub>1</sub>-Rezeptors gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Peptide gemäß Anspruch 1 oder 2 erkennen.
4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Peptid der SEQ ID Nr. 1 erkennen bzw. seine Mutanten und Varianten.
5. Antigenes Mittel zum Nachweis von Präeklampsie, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 2, vorzugsweise der SEQ ID Nr. 1, enthält.
6. Immunogenes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 2, vorzugsweise der SEQ ID Nr. 1, enthält, das die Produktion von Antikörpern, die fähig sind, Autoantigene bei Präeklampsie zu erkennen, induziert.
7. Testkit zur Bestimmung von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern zum Nachweis von Präeklampsie enthaltend mindestens ein Peptid gemäß Anspruch 1 bis 2.

24.12.93

---

8. Verfahren zum Nachweis von Anti-AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß man die zu untersuchende Probe mit mindestens einem Peptid der Ansprüche 1 bis 2 in Kontakt bringt oder einer Verbindung dieser Peptide mit einem Trägermaterial unter solchen Bedingungen, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion zulassen und den Nachweis mittels an sich bekannter chemischer oder physikalischer Methoden führt.

---

9. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 bis 2 zur Herstellung therapeutischer Mittel gegen Präeklampsie.

